

ウールケラチンの製品化技術に関する研究

—ウールケラチンの成膜技術—

茶谷悦司、柴山幹生

1. はじめに

繊維廃棄物は、深刻化する環境問題の中にあって、現在クローズアップされている問題の一つである。これら廃棄物の再資源化については、産・学・官を問わず活発な研究が行われている。

羊毛工業からさまざまな羊毛くずが排出されるが、羊毛はプロテインエンジニアリング素材として有用なケラチンタンパク質から成っており、それを機能性素材として展開することは、繊維廃棄物処理問題に対する解決策の一つとなるだけでなく、天然資源の有効利用という観点からも重要な意味を持つものである。

そこで我々は、羊毛繊維からケラチンタンパク質を抽出し、膜や繊維に再構成することにより、機能性素材として応用する技術に取り組むこととした。羊毛ケラチンは天然の架橋構造を備えているため不溶性であるが、シスチン架橋を開裂すれば可溶化させることができる。昨年度板津らは、還元抽出法により羊毛から比較的高分子量で活性のあるケラチンタンパク水溶液を得るための検討を行った¹⁾。本年度は昨年度の検討で得られた還元抽出ケラチンを用い、それを膜に再構成するべく成膜条件の検討を行い、その機能性を評価することとした。

2. 実験方法

2. 1 ウールケラチン抽出、精製、濃縮条件

還元抽出処理ウールケラチンは、羊毛トップを原料とし、メタ重亜硫酸ナトリウム（還元剤）、8M尿素水溶液（タンパク質変性剤）、ドデシル硫酸ナトリウム（界面活性剤）を併用して染色用ミニカラーで100℃、30分処理することにより得た。この溶液と残留不溶物を濾別し、透析により過剰の可溶化試薬を除いた後、遠心分離で非可溶分を取り除いた。このようにして得たケラチン水溶液を、エバポレータでタンパク濃度15%程度に調整し、製膜に供した。（図1）



図1 ウールケラチンフィルムの成膜

2. 2 製膜方法

タンパク濃度15%程度の還元抽出処理ケラチン水溶液を水平なポリエチレンフィルム上に流延し、恒温室内で風乾することにより製膜した。

2. 3 延伸・熱処理方法

延伸は、手動延伸機を用い、膜の両端を一方方向へゆっくり引き伸ばして行い、延伸率は延伸前後の延伸方向の膜寸法比で示した。

湿熱処理は、試料膜の両端を固定し、真空湿熱処理機で80~100℃、2~10分行った。

乾熱処理は、試料膜の両端を固定し、80~180℃の温度範囲で行った。

2. 4 赤外吸収スペクトル分析

赤外吸収スペクトルは、日本電子株式会社製JIR-5300型フーリエ変換赤外分光光度計を使用し、全反射測定ユニット(IR-ATR100)を取り付け測定した。IRE(内部反射素子)は、Ge(ゲルマニウム)45°(入射角)を使用した。

2. 5 引張り試験

フィルムの強伸度を、試料長20mm、試料幅5mm、引張り速度20mm/min、20℃、65%RHで測定した。

2. 6 重金属吸着試験

吸着処理は、初濃度100ppm、pH3.4、4.1、5.1、5.9、6.9、7.8のPb²⁺水溶液50m³中に試料約1gを投入し、50℃、1時間行った。吸着量は、島津原子吸光光度計AA-640を用い、吸着処理後の濾液の金属イオン残存濃度を測定することにより求めた。

3. 結果と考察

3. 1 ケラチン/グリセリン及びその誘導体ブレンド膜の評価

図1の方法で得たケラチン水溶液の性状を表1に示す。この水溶液をそのまま水平なポリエチレンフィルム上にキャストし、風乾させることによってケラチンフィルムを得ることも可能であるが、そのフィルムは弱く脆いため容易に碎けてしまう。そこで、ケラチンにグリセリン及びその誘導体をブレンドすることにより、フィルムの物性を改質させることを試みた。表2に、ここで検討した改質剤の組成とケラチン溶液との相溶性、造膜性、強伸度等につき検討した結果を示す。相溶性、フィルムの強伸度はケラチンと各サンプルとのブレンド比を80/20として評価した。この表に示すとおり、グリセリンとその誘導体をブレンドした系で良好な結果が得られた。そのなかでも、グリセリンをグリシジルエーテル化したものをブレンドした系で、フィルム強度の著しい増加がみられた。グリシジル基は、ケラチンタンパク中のアミノ基、カルボキシル基、メルカプト基と反応し、ケラチン分子鎖間を架橋するものと考えられ、強度増加につながったと思われる。

ケラチンフィルムの強伸度特性は、その含水率によって大きく変化する。湿度の低い環境下で放置したフィルムは可撓性に乏しく、多湿条件下で放置したフィルムはやや可撓性に富む。そこでここでは20℃、65%RHの恒温恒湿室で調湿したフィルムの含水率を測定

表1 製膜試験に供したケラチン水溶液の性状

外観	半透明液体
粘度(30℃)	90.5cps
タンパク濃度(ビュレット法)	14.8%
SH基の量(エルマン法)	1.5×10 ⁵ mol/l

表2 検討したケラチン改質剤と相溶性評価結果

サンプル	A	B	C	D	E	F	G	H
組成	グリセリン E010モル付 加物	グリセリン E0、P0付加 物	サンプルBの 末端ブロック ドイソシアネート	グリセリン ポリグリシジル エーテル	ステアリル アルコール E07モル付 加物	ステアリル アミド E07モル付 加物	オクチルアルコール E01モル付加 物のフォスフェ ートK塩	グリセリン
pH	中性	中性	弱酸性	中性	中性	中性	中性	中性
イオン型	ノニオン	ノニオン	アニオン	ノニオン	ノニオン	ノニオン	アニオン	ノニオン
相溶性 ¹⁾	○	○	△	○	×	×	×	○
膜の状態	△(くもり)	○(透明)	○	○	△	△	×	○
強度 (kg/mm ²)	0.29	0.40	0.42	0.64	0.29	0.42	測定不能	0.13
伸度 (%)	244.3	148.2	178.4	137.0	58.1	15.0	測定不能	269.7

*1) 相溶性、フィルムの強伸度はケラチン/各サンプル=8/2で評価した。

し、フィルムの強伸度との関係を見ることとした。図2にグリセリンをブレンドしたケラチンフィルムのブレンド比と強度、含水率の関係を示す。グリセリンをブレンドした系は、グリセリンの保湿力により、その添加量が増すとフィルムの含水率が増加し、強度が低下した。伸度については、添加量が増すと増す傾向を示し、ブレンド比80/20で平衡に達した (図3)。グリセリンをブレンドすることにより、分子鎖間に滑りを与え、フィルムに柔軟性が付与できることがわかった。

一方、グリシジルエーテル化したグリセリンをブレンドしたケラチンフィルムは、添加量が増すと含水率が減少した (図4)。グリシジル化により保湿力が減少したためと考えら

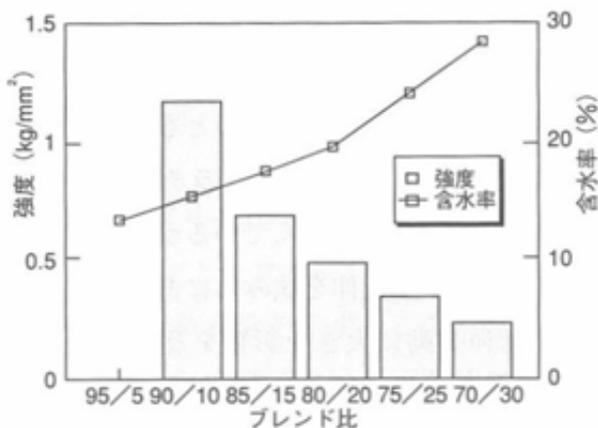


図2 ケラチン/グリセリンのブレンド比とフィルム強度、含水率の関係

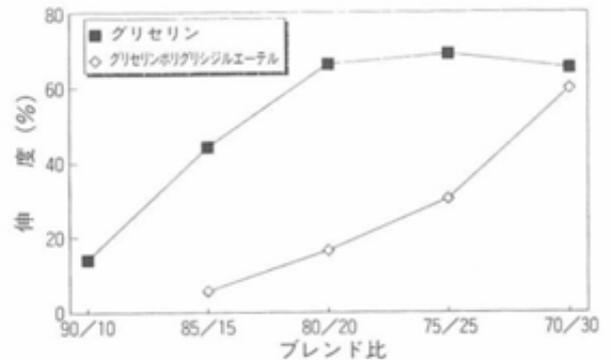


図3 ブレンド比と伸度との関係 (改質剤間の差)

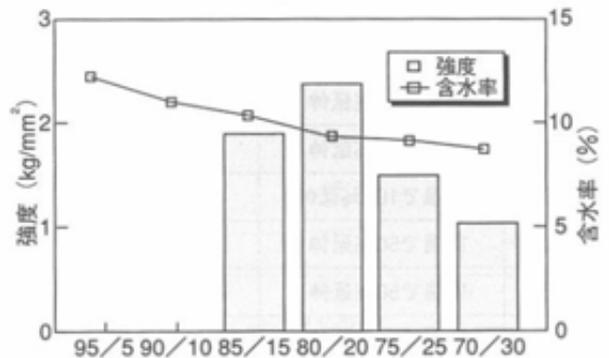


図4 ケラチン/グリセリンポリグリシジルエーテルのブレンド比と強度、含水率の関係

れる。また、強度については、同一のブレンド比でグリセリンと比較すると約2倍ほどあり (図5)、グリシジル基がケラチンタンパク中の官能基と反応し、分子間架橋されていることがうかがわれる。なお、伸度については、添加量が増すと増す傾向を示した (図3)。

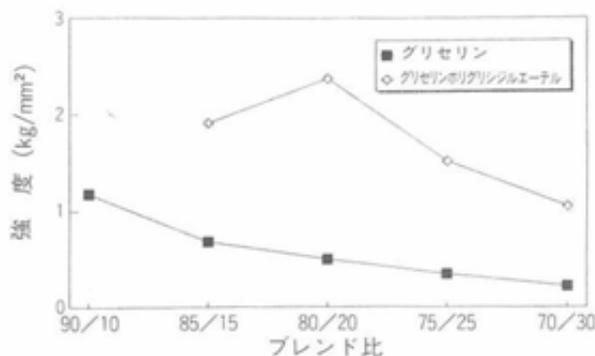


図5 ブレンド比と強度との関係
(改質剤間の差)

3. 2 ケラチンフィルムの延伸、熱処理方法の検討

3. 2. 1 室温での延伸処理

ケラチン/グリセリン=80/20のフィルムを用い、室温での延伸処理を試みた。表3に延伸-熱処理条件を示し、図6にその試験結果を示す。評価は、延伸方向のフィルム長保持率と強度増加率で行った。室温で延伸処理のみしたフィルムを、恒温恒湿室内(20℃、

表3 延伸-後処理条件

処理	延伸処理	後処理
A	温室で30%延伸	————
B	室温で50%延伸	————
C	室温で100%延伸	————
D	室温で50%延伸	蒸気5分あてる
E	室温で50%延伸	糸蒸気でセット ^{*1)}
F	室温で50%延伸	90℃×10分

*1) 真空8分、温度80~100℃×2~10分、真空8分

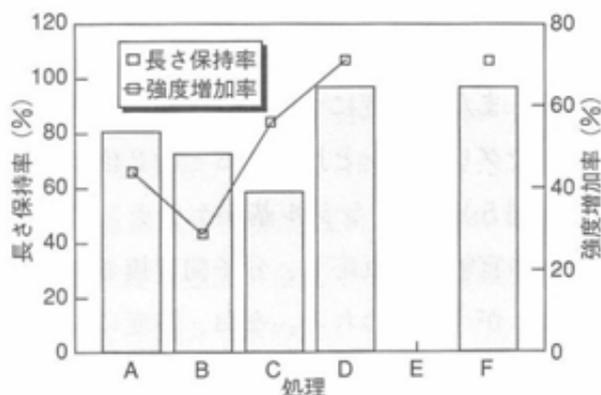


図6 延伸方向フィルム長さ保持率と強度

65%RH) で2日間調湿した後の延伸方向の長さは、30%延伸処理で80%、50%延伸処理で70%、100%延伸処理で50%程度しか保持できなかった(図6中の処理A、B、C)。また、強度についても若干増加するにとどまった。そこで、延伸したフィルムを乾・湿熱処理することにより、フィルムの形態を安定化させることを試みた。延伸処理後、乾・湿熱処理を行えば延伸方向の長さが90%以上保持でき、形態が安定することがわかった(図6中の処理D、F)。しかしながら、強度については延伸による効果は少なく、乾・湿熱処理による強伸度変化は、3. 2. 3で述べる)。延伸により、フィルム強度に影響を及ぼすほど、ケラチン分子鎖の高次構造が変化しているようには考えられない結果となった。

なお、処理Eにおいては、真空湿熱処理機での後処理でフィルムが切断したため、強伸度等の評価ができなかった。

3. 2. 2 熱水(95℃の緩衝溶液)中での延伸処理

表4に、羊毛ケラチンタンパク成分の等電点、分子量等を示す。分子量20,000~28,000のものは、フィブリル間に存在する間充タンパク(Matrix)であり、分子量41,000~60,000のものは、マイクロ繊維由来である。これらはシスチン含量の多少で高硫黄成分、低硫黄成分として区別されることもある。

図1で示した方法で得たケラチン水溶液は、どの成分をどれだけ含んでいるかは不明であるが、熱水中で延伸を試みるにあたり、そのpHは延伸挙動に大きな影響を及ぼすものと考えられる。そこで、pH3.1、4.6、6.2、7.0、8.0の緩衝液を作成し、手動延伸機に固定したフィルムを、95℃の緩衝液中に5分間浸漬

表4 羊毛のケラチンタンパク成分

ケラチンタンパク			等電点	分子量	アミノ酸組成			
					half-Cystine (S)	酸性アミノ酸 (COOH)	塩基性アミノ酸 (NH ₂ 等)	疎水性アミノ酸
間充タンパク (Matrix)	球状	中性	6.5~7.7	20,000	16~19	12~13	8~11	21~26
		酸性	5.0~7.0	26,000~28,000				
繊維タンパク (Microfibrils)	棒状	酸性	4.8~5.1	41,000~44,000	5~6	22~23	11~12	34~37
		中性	6.3~7.1	57,000~60,000				

したのち延伸し、破断に至るまでの伸度を測定した。図7に、グリセリンをブレンドしたフィルムの熱水中での破断伸度のpH依存性を示す。pH6.2以下においては、約30%程度の延伸で破断に至るが、pH8.0においては、約100%ほどで破断した。熱水中の延伸では、膨潤によるフィルムの弛みをなくした後数%の延伸で破断するため、ほとんどフィルムを引き延ばすことが出来ず、ここに示した破断伸度は、各々のpHにおけるフィルムの膨潤度合いを示す尺度と考えられる。

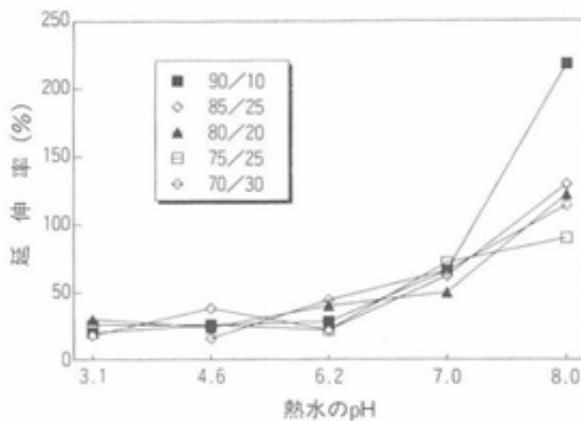


図7 熱水中の延伸率のpH依存性 (グリセリン)

図8に、グリセリンポリグリシジルエーテルをブレンドしたフィルムの、熱水中での破断伸度のpH依存性を示す。この系は、ここで試験した全pH域において、グリセリンをブレンドした系と比較して膨潤が少なく、安定に形態を保っていることがわかる (図9)。

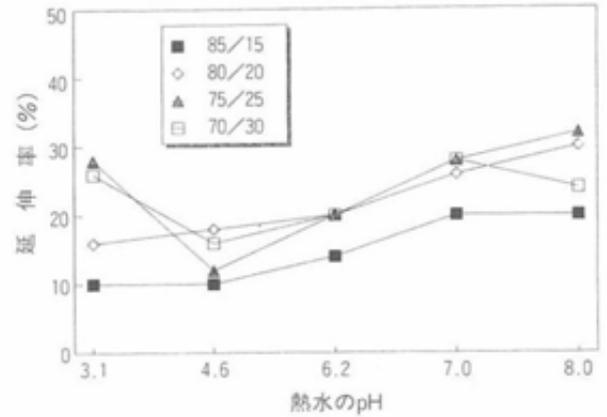


図8 熱水中の延伸率のpH依存性 (グリセリンポリグリシジルエーテル)

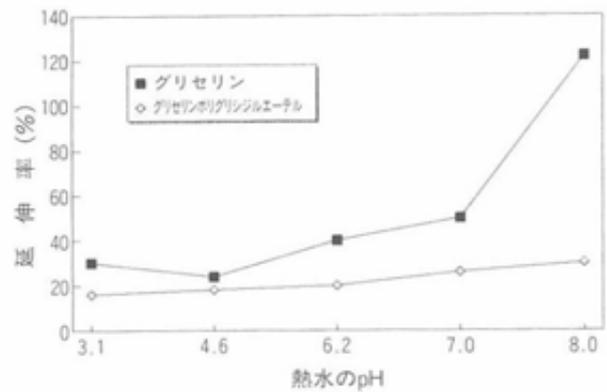


図9 熱水中の延伸率のpH依存性 ブレンド比80/20での比較

熱水中での延伸処理後のフィルムは、pH6.2以下のpH域においては、処理後フィルムが乾燥した後も透明性を保持しているが、それ以上のpH域になると、フィルムから一部ケラチンタンパクが溶け出し、乾燥後のフィルムは白濁した。また、全pH域において、ブレンドしたグリセリン等が溶け出すため、可撓性が失われた。

3. 2. 3 乾・湿熱処理による強度変化

図10に、ケラチン/グリセリン=80/20フィルムの、乾熱処理時間とフィルムの強伸度変化の関係を示す。処理時間とともに強度が増し、30分で最大となった。図11に、ケラチン/グリセリン系の、ブレンド比と乾熱処理による強度変化の関係を、図12に、ブレンド

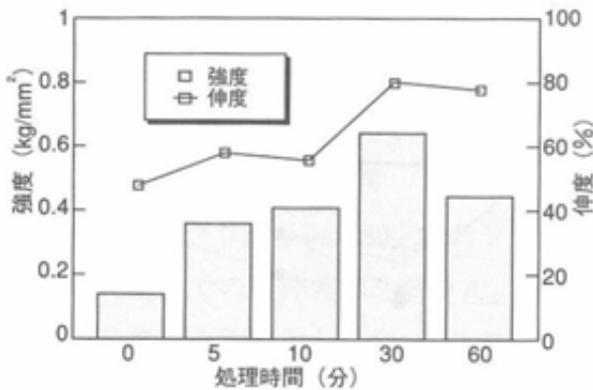


図10 乾熱処理による強伸度変化
100°C、ケラチン/グリセリン=8/2

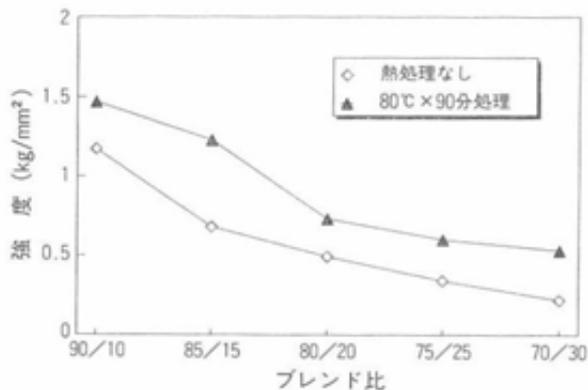


図11 乾熱処理による強度変化
ブレンド比と強度の関係(グリセリン)

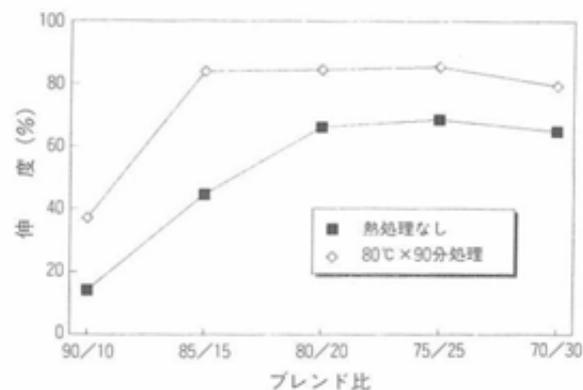


図12 乾熱処理による伸度変化
ブレンド比と伸度(グリセリン)

比と乾熱処理による伸度変化の関係を示す。いずれのブレンド比においても、乾熱処理により強伸度が向上した。

一方、真空6分、セット100°C×10分、真空6分の条件で、真空湿熱処理機で処理したケラチン/グリセリン=8/2フィルムの強伸度は、それぞれ0.94kg/mm²、17.7%となり（未処理フィルムの強伸度はそれぞれ0.12kg/mm²、48.5%）湿熱処理によっても強度が増加することが確認できた。

3. 2. 4 延伸、乾・湿熱処理による二次構造変化

羊毛繊維の延伸及び熱処理にともなう構造変化、特に α - β 転移に関する研究は、古くから数多く行われてきた²⁾。羊毛ケラチンを構成する成分タンパク質の延伸及び熱処理にともなう構造変化については、S-カルボキシメチルケラチンフィルムについて、X線回折やFT-IRにより研究された³⁾。古賀らは、FT-IRにおけるアミドIIバンドとケラチンの二次構造との関連に注目し、熱処理により不規則構造の強度が増大し、 α 構造がくずれ不規則構造へと変化することを示した⁴⁾。また、S-カルボキシメチルケラチンフィルムの延伸による構造変化についても同様に検討し、延伸により α 構造は微減し、ランダムコイルが大幅に減少し、 β 構造へと変化してゆくことを示した⁴⁾。

タンパク質の二次構造には、図13に示すように、らせん構造(α ヘリックス)やポリペプチド鎖がほぼ延伸した構造(β シート)、不規則構造がある。タンパク質の二次構造と赤外スペクトルの関係については多くの議論があるが、ケラチンの二次構造とアミドIIバンドとの関係は、表5に示すとおりである。ここでは、ケラチンフィルムの延伸、乾・湿

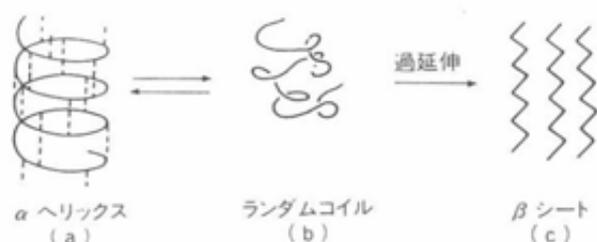


図13 タンパク質の二次構造⁵⁾

表5 アミドⅡバンドの二次構造との関係

構造	偏光性	波数 (cm ⁻¹)	ケラチン
ランダムコイル		1535	
αヘリックス	//	1516 (弱い)	
	⊥	1546	1560
平行β構造	//	1530	1500
	⊥	1550	
逆平行β構造	//	1530	1500

熱処理による二次構造変化を、赤外吸収スペクトルでとらえるべく検討した。

図14に、ケラチン/グリセリン=80/20フィルムの、乾熱処理によるIRスペクトルの変化を示す。高温処理を行うと、アミドⅡ (1500~1560cm⁻¹付近) のピークが、低波数

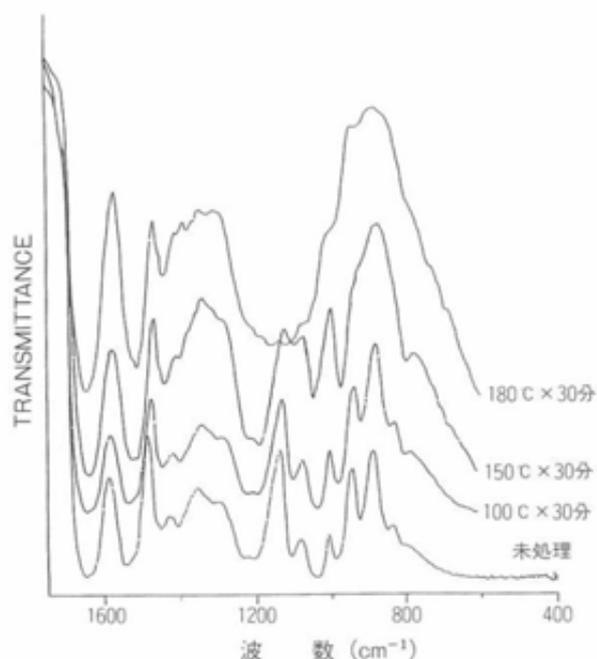


図14 ケラチンフィルムの乾熱処理によるIRスペクトルの変化

側へシフトすることがわかる。アミドⅡバンドは、ケラチン分子鎖の様々な二次構造に起因する吸収の重なりとして現れるので、この変化をケラチンの二次構造変化と対応させ理解することは難しい。古賀らは、このバンドをカーブフィット法によるシュミレーションにより、ランダムコイルの吸収位置 (1535cm⁻¹)、αヘリックスの吸収位置 (1516cm⁻¹ (平行吸収成分) 1546cm⁻¹ (垂直吸収成分))、およびβシートの吸収位置 (1530cm⁻¹ (平行吸収成分) 1550cm⁻¹ (垂直吸収成分)) を決定した。その結果が先に示したものとなったわけだが、その考えに基づき図14に示したIRスペクトルの変化を考察すれば、100℃以上の乾熱処理を行うとα構造がくずれ、不規則構造へと変化してゆくと考えられる。また、硫黄酸化物の振動に帰属される吸収帯 (1050、1200cm⁻¹付近) が、高温処理により消滅していることにも気付く。亜硫酸ナトリウムでSS結合を開裂させると、メルカプト基 (タンパク-SH) とブンテ塩 (タンパク-S-SO₃Na) が生成する。硫黄酸化物に帰属される吸収帯が消滅したことは、熱処理によりSS結合が再生されたためであるのか、他の構造変化によるものかは、はっきりしない。

図15に、真空6分、セット100℃×10分、真空6分の条件で真空湿熱処理機で処理したもの、および室温で100%延伸したケラチン/グリセリン=8/2フィルムのIRスペクトルを示す。湿熱処理を施したフィルムのIRスペクトルは、未処理のそれとほとんど変わらなかった。一方、100%延伸したフィルムのIRスペクトルにおいては、アミドⅢ (1320~1230cm⁻¹) あたりに変化がみられるが、それがどのような高次構造変化によるものかは、はっきりしない。

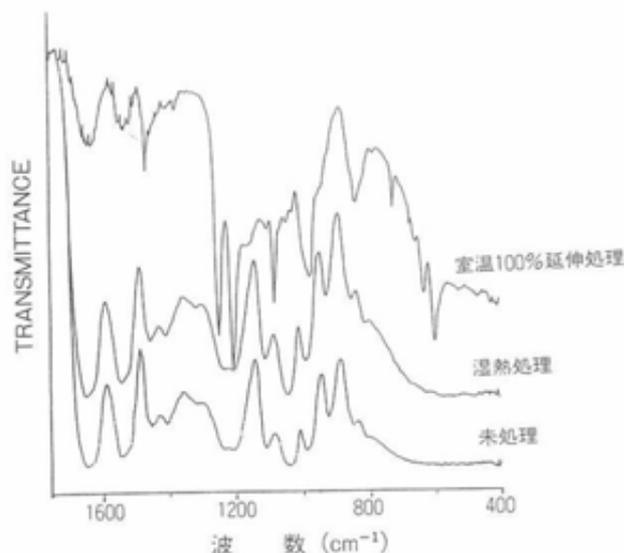


図15 ケラチンフィルムの湿熱処理、延伸処理によるIRスペクトルの変化

3. 3 ケラチンフィルムの機能性評価

羊毛ケラチンが、イオン交換能及びキレート形成能を有することは、古くから知られていたが、最近環境問題が認識されるに及び、羊毛ケラチンを機能性素材、特に重金属吸着剤として用いる試みがなされた。しかしながら、これらの研究の多くは繊維の形態を保ったままで行われたため、必ずしも目的にかなったものとはいいがたかった。宮本らは、羊毛ケラチンを還元して得たケラテインゲルの重金属吸着能を調べた^{6,7)}。ケラテインゲル

は、 Hg^{2+} に対する高い選択吸着性を示し、酸性領域における Hg^{2+} 吸着は、主としてメルカプト基とのキレートあるいは化学反応性の吸着機構によるものであり、中性及びアルカリ領域では、主鎖のペプチド結合及び電気陰性度の高いS、N、O原子を含むアミノ酸残基の協同効果によるものであるとしている。

ケラチンは両性電解質であり、重金属吸着量は処理液のpHに依存する。そこでここでは、ケラチンフィルムの Pb^{2+} 吸着量のpH依存性を評価した。吸着処理条件と試験結果を表6と図16に示す。ここではケラチンフィルムの吸着能を、ケラチンタンパクの抽出原料として用いたウールスライバーとの比較により評価した。吸着能は、図16に示したように酸

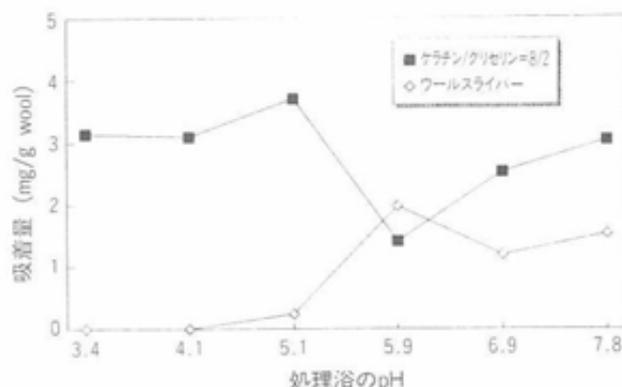


図16 鉛吸着量のpH依存性

表6 ウールケラチンフィルムの金属吸着能評価結果

pH		3.4	4.1	5.1	5.9	6.9	7.8
Pb初浴濃度 (ppm)		100.7	102.3	96.3	56.4	58.4	76.2
試料重量 (g)	ケラチン/グリセリンフィルム	0.67	0.84	0.88	0.97	0.82	0.88
	ウールスライバー	0.93	1.01	1.00	0.97	0.83	10.6
吸着処理後のPb濃度 (ppm)	ケラチン/グリセリンフィルム	58.7	50.3	31.2	29.1	17.1	22.8
	ウールスライバー	102.5	103.9	91.5	18.0	38.8	43.9
Pb吸着量 (mg/g wool)	ケラチン/グリセリンフィルム	3.14	3.09	3.70	1.40	2.52	3.03
	ウールスライバー	0	0	0.24	1.98	1.18	1.53

金属吸着処理条件

Pb: $Pb(CH_3COO)_2 \cdot 3H_2O$

試験前のPb濃度: 50~100ppm

処理温度、時間: 50℃、1時間

試料: 約1g

液量: 50ml

性域において大きな差がみられた。これは Pb^{2+} とキレートあるいは化学反応する能力のあるメルカプト基が、フィルムに多く存在するためであると考えられる。また、中性及びアルカリ領域では、酸性域においてみられたような大きな差とはならなかった。

また、先に述べたように、この領域ではフィルムから一部ケラチンタンパクが溶け出し、試験後乾燥したフィルムは白濁した。

4. まとめ

以上、ケラチンフィルムの製膜の検討、及び機能性評価結果をまとめると次のようになる。

- ア. グリセリンポリグリシジルエーテルをブレンドしたフィルムはケラチン分子鎖間を架橋すると思われる、グリセリンをブレンドしたフィルムと比較して強度が高く、熱水中で安定であることがわかった。
- イ. ケラチンフィルムの延伸処理を試みたが、フィルムの強伸度特性などへの影響は期待したほど現れなかった。
- ウ. 乾熱処理によりフィルムの強度は増し、二次構造も変化していることが確認できたが、構造変化の詳細はわからなかった。
- エ. Pb^{2+} 吸着能については、抽出原料として

用いたウールスライバーと比較して特に酸性域で優れることがわかった。

謝 辞

本研究を行うにあたり、改質剤サンプルの提供をいただきました、竹本油脂株式会社に対し厚く感謝の意を表します。

参考文献

- 1) 板津、茶谷, テキスタイル&ファッション, 13,500 (1996)
- 2) R. D. B. Fraser and T. P. MacRae, "Conformation in Fibrous Proteins", Academic Press, N.Y. (1973)
- 3) H. Sakabe, T. Miyamoto and H. Inagaki, Sen-i Gakkaishi, 37, T-273 (1981)
- 4) J. Koga, K. Kawaguchi, E. Nishio, K. Joko, N. Ikuta, I. Abe, T. Hirashima, J. Appl. Polym. Sci., 37, 2131 (1989)
- 5) 村橋俊介ほか編, 高分子化学, p303, 共立出版 (1973)
- 6) T. Miyamoto, M. Sugitani, H. Ito, H. Inagaki, Sen-i Gakkaishi, 34, T-16 (1978)
- 7) T. Miyamoto, H. Ito, M. Sugitani, H. Inagaki, *ibid.*, 34, T-406 (1978)